

**Möglichkeit und Anwendung der selektiven Bindung
von α_1 -Antitrypsin an Trypsincellulose — Auftreten
zweier Arten von α_1 -Antitrypsin
im menschlichen Serum**

Franz Pecher

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551910_0019

Aus dem Biochemischen Laboratorium der
Hals- Nasen- Ohren- Klinik der Universität München

Direktor: Prof.Dr.H.H. Naumann

Möglichkeit und Anwendung der selektiven Bindung von
 a_1 - Antitrypsin an Trypsincellulose - Auftreten zweier
Arten von a_1 - Antitrypsin im menschlichen Serum

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu
München
vorgelegt

von
Franz Pecher
Königsbrunn

1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. K. Hochstrasser

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.H. Naumann

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.5.1975



Meinen Eltern
mit herzlichem Dank
gewidmet

I. Abkürzungen	1
II. Zusammenfassung	2
III. Einleitung	3
IV. Allgemeiner Teil	
A. Wissenschaftliches Grundwissen über α_1 - Antitrypsin	5
1. Chemisch-physikalische Eigenschaften	5
2. Vorkommen im Körper	8
3. Wirkung und Hemmechanismus	8
4. Genetische Befunde	9
5. Physiologische und pathologische Verhältnisse	12
V. Spezieller Teil	
A. Theoretische Auswertung	21
1. Ergebnisse	21
a) Künstliche komplexierung	21
b) Nachweis der spezifischen Selekti- vität des Trypsinharzes am	
aa) Künstlichen Komplex	22
ab) Natürlichen Komplex	23
c) Auftreten von α_1 -Antitrypsin mit verschiedener Affinität zu Trypsin	23
d) Vergleichende kinetische Betrachtungen von Normalserum und α_1 -Antitrypsin- Mangelserum	25

e) Pherogramme einiger Seren	27
2. Diskussion der Ergebnisse	33
B. Experimentelle Durchführung	36
1. Material	
a) Liste des verwendeten Materials	36
b) Gewinnung der Seren	37
2. Methoden	
a) Bestimmung der Serumhemmkapazität	37
b) Radiale Immunodiffusion	39
c) Herstellung von α_1 -Antitrypsin- Trypsin-Komplexen	39
d) Verarbeitung und Anwendung des Trypsin-Chymotrypsin-Harzes	40
e) Selektive Adsorption des freien α_1 -Antitrypsin an das Harz	41
f) Durchführung der Elektrophorese	42
g) Erläuternde Hinweise zur verglei- chenden Enzymkinetik von normalem α_1 -Antitrypsin- und α_1 -Antitrypsin- mangelserum	42
VI. Literaturverzeichnis	44
VII. Danksagung	48
VIII. Lebenslauf	49

Abkürzungen

AAKE	= Antigen - Antikörper - Kreuz - Elektrophorese
α_1 -At	= α_1 - Antitrypsin
Bapna	= N ^a - Benzoylarginin - D _L - 4Nitroanilid
Cole	= chronisch obstruktives Lungenemphysem
PI-System	= Proteinase - Inhibitor - System
STIK	= Serum - Trypsin - Inhibitor - Kapazität
TRA-Puffer	= Triäthanolamin - HCl - Puffer

Zusammenfassung

Bei verschiedenen pathologischen Diagnosen werden bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese des α_1 -Antitrypsins Doppelgipfel beobachtet. Der zweite in Richtung Kathode verschobene Gipfel wird als Komplex zwischen α_1 -Antitrypsin und Proteasen gedeutet. Durch Adsorption an unlösliche Trypsincellulose gelingt es, das freie, inhibitorisch aktive α_1 -Antitrypsin bis auf einen Rest aus dem Serum zu entfernen. Komplexgebundenes, inhibitorisch inaktives α_1 -Antitrypsin verbleibt im Serum; ebenso ein geringer Rest von inaktiven, freien α_1 -Antitrypsin. Es besitzt die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit wie normales α_1 -At. Der Unterschied liegt in der Affinität zu Trypsin. Mit Hilfe der selektiven Bindung des α_1 -Antitrypsin an das Celluloseharz besteht außerdem die Möglichkeit einen enzymkinetischen Vergleich zwischen Serum mit normalem α_1 -Antitrypsingehalt und Mangels Serum anzustellen. Hierbei zeigt sich zwischen beiden Seren kein gravierender Unterschied.

Einleitung

Als einer der ersten bemerkte Böden die Fähigkeit des Serums Proteasen zu hemmen. Er konnte zeigen, daß auf Zugabe von Rinder- oder Pferdeserum zu einem Renin - Milchgemisch keine Gerinnung erfolgte. 1897 berichten Camus und Gley, Hahn, Pugliese und Coggi von dem Auftreten einer antitryptischen Aktivität, die nach Landsteiner 1900 und Opie 1907 zum größten Teil in der Albuminfraktion liegt.

Jacobsson 1955 bestimmte diesen größten Teil, der in der α_1 -Globulinzone wanderte, zu 90%. Die restlichen 10% fand er in der α_2 -Globulinzone.

Nachdem viele Theorien über die chemische Zusammensetzung der Inhibitoren in Umlauf waren (Bauer, Schwarz, Hedin, Wiens, Eisner), gelang es schließlich in den Laboratorien der Behringwerke (Schultze et al. 1965), den von Jacobsson bestimmten Hauptbestandteil als ein α_1 - 3,55 - Glykoprotein zu identifizieren. Aber erst 1962, also sieben Jahre nachdem die chemische Zusammensetzung bekannt war, erkannten dieselben Autoren, daß es sich bei dem Glykoprotein um den hauptsächlichen Trypsininhibitor des Serums handelte. Auf Grund dieser Hemmwirkung wurde es α_1 -Antitrypsin genannt. Neben dem α_1 -Antitrypsin gelang es Heimbürger und Schwick, Heimbürger und Haupt 1966 mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese auf fibrinhaltigen

Platten 5 weitere Proteaseninhibitoren nachzuweisen, das α_2 -Antitrypsin, α_2 -Antichymotrypsin, α_2 -Makroglobulin, Inter- α_2 -Intertrypsin und das Antithrombin.

Im Verlauf von Untersuchungen mit physiologischen und pathologischen Diagnosen wurden Serum- α_1 -Antitrypsinkonzentrationen bestimmt. Dabei ergaben sich kennzeichnende Veränderungen (Ganrot et al. 1967, Greifenberg 1909, Ascoli und Bezzola 1903, Küppers 1968 b).

Von großer klinischer Bedeutung war dann die Erkenntnis des Zusammenhanges zwischen vererbbarem α_1 -Antitrypsinmangel und chronisch obstruktiven Lungenemphysem, der zum ersten Mal von Eriksson 1964 beschrieben wurde. Es ist jedoch bis heute noch nicht einwandfrei geklärt, ob der Antitrypsinmangel durch eine verminderte Syntheserate, oder durch eine mutationsbedingte veränderte Genstruktur entsteht. Um dies zu klären, befaßt sich deshalb diese Arbeit mit einer vergleichenden kinetischen Betrachtung von normalem- und Mangel- α_1 -Antitrypsin.

Hochstrasser 1972 konnte bei bestimmten Krankheitsbildern im Serum Doppelgipfel beobachten, die als freies α_1 -Antitrypsin und als komplexgebundenes α_1 -Antitrypsin ausgelegt wurden. Die vorliegende Arbeit befaßt sich weiterhin damit, nach einer Methode zu suchen, mit der es gelingt, freies α_1 -Antitrypsin selektiv aus dem Serum zu entfernen, um durch Einsatz großer Serummengen vorliegende Komplexe zu finden, deren Vorhandensein und Konzen-

tration ein Maß für die Stärke der entzündlichen Vorgänge sein dürfte.

Allgemeiner Teil

Wissenschaftliches Grundwissen über α_1 -Antitrypsin

1. Chemisch-physikalische Eigenschaften des α_1 -Antitrypsin
Die sechs Proteaseninhibitoren α_1 -Antitrypsin, α_2 -Antitrypsin, α_2 -Antichymotrypsin, α_2 -Makroglobulin, Inter- α_2 -Intertrypsin und Antithrombin lassen sich auf Grund ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit z.B. in Polyacrylamidgel trennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Ladung, der Form und der Größe der Moleküle. Für α_1 -Antitrypsin ergaben sich folgende Werte (Heimbürger et al. 1964):

	mittl. Konz. mg/%	MW	uMol/l	Peptid %	K.hydr. %
α_1 -At	290 $\pm$ 45	54000	54.0	86	12.2

Die prozentuelle Verteilung an Kohlehydraten beträgt:

Hexosen	5.0
Fruktosen	0.2
Acetylhexoseamine	3.6
Sialic-Acid	3.4

Interessant an der Aminosäureverteilung erscheint die Tatsache, daß α_1 -Antitrypsin kein Cystin enthält. Durch das Fehlen der Disulfidbrücken läßt sich evtl. auch die schnelle Inaktivierung bei pH-Werten im sauren Bereich (pH kleiner 5.0) erklären.

Aminosäurezusammensetzung in Prozent (Heimbürger 1964)

Lysin	8.41
Histidin	3.33
Ammonia	1.45
Arginin	2.33
Asparagins.	9.75
Threonin	5.66
Serin	3.52
Glutamins.	12.92
Prolin	3.26
Glycin	2.38
Alanin	3.55
Cystin	0.00
Valin	4.74
Methionin	2.14
Isoleucin	3.89
Leucin	9.90
Thyrosin	2.14
Phenylalanin	7.63
Tryptophan	0.55

Die Sedimentationskonstante beträgt

$$S_{20,w}^0 = 3.3S \text{ (Shamash und Rimon 1966)}$$

$$= 3.4S \text{ (Bundy und Mehl 1959)}$$

Die Angaben über das Molekulargewicht schwanken zwischen

$$45000 \text{ (Bundy und Mehl 1959)}$$

$$47000 \text{ (Rimon et al. 1966)}$$

$$55000 \text{ (Shamash und Rimon 1966)}$$

$$54000 \text{ (Schönenberger 1955)}$$

Beim α_1 -Antitrypsin handelt es sich also um ein α_1 -3.55-Glykoprotein. Es verdankt seinen Namen der Hemmwirkung gegenüber der Protease Trypsin (Schultze 1962). 90% der gesamten Trypsininhibitorkapazität des Serums liegt in

der α_1 -Globulinzone, in der es 90% des Proteins repräsentiert (Jacobsson 1953, Eriksson 1965).

2. Vorkommen im Körper

Außer im Blut ist dieses Protein im Speichel, im Sekret des oberen Respirationstraktes, in der Muttermilch, im Urin, in der Amnionflüssigkeit und in der Tränen- und Cerebrospinalflüssigkeit enthalten (Talamo 1967, Hyslop 1969, Hochstrasser 1971).

3. Wirkung und Hemmechanismus

Der genaue Zusammenhang zwischen der in vitro nachweisbaren Hemmwirkung und der physiologischen Bedeutung ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Es ist bekannt, daß α_1 -Antitrypsin Trypsin, Chymotrypsin, Schweinepankreaselastase, Plasmin (Heimburger und Haupt 1966, Schultze 1962), Thrombin (Rimon et al. 1966), Proteinasen aus Leukozyten (Küppers und Bearn 1966), und *Aspergillus oryzae* (Lindvall 1966) hemmt; wobei die Reaktion mit Trypsin und Chymotrypsin nahezu stöchiometrisch und irreversibel verläuft.

Die Reaktion zwischen Proteinase und Inhibitor führt (Heimburger 1970) zu einer Komplexverbindung, wie man auf Grund der veränderten Beweglichkeit im elektrischen Feld (Immunelektrophorese), bedingt durch verändertes Mo-

lekulargewicht und veränderte Ladung, feststellen kann. Ozawa und Laskowski 1966 halten es für möglich, daß analog wie beim Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor ein nicht aktiver Enzymsubstratkomplex gebildet wird, wobei das Enzym, nach Hydrolyse einer als Hemmzentrum bezeichneten Peptidbindung, im Inhibitor kovalent gebunden wird. Hochstrasser 1972 konnte bereits bei Infekten (Osteomyelitis, Entzündungen mit massiver Leukozytose) α_1 -Antitrypsin in inhibitorisch inaktiver, an Proteasen gebundener Form im Liquor und im Serum nachweisen. Die auftretende Menge an Komplex scheint hierbei ein Maß für die Stärke des ablaufenden pathologischen Prozesses zu sein.

Auch Ohlsson 1971 fand bei Hunden Komplexverbindungen zwischen Proteasen und α_1 -Antitrypsin, als er Trypsin bzw. Chymotrypsin per Dauerinfusion applizierte. Nach Absetzen der Infusion verschwanden die Komplexe rasch aus dem Blut. Diese beiden Ergebnisse scheinen die physiologische Funktion als Proteaseninhibitor auch in vivo zu erhärten.

4. Genetische Befunde

Laurell und Eriksson 1963 erkannten unterschiedliche α_1 -Antitrypsinkonzentrationen. Das Minimum lag etwa bei einem zehntel der normalen Menge. Weitere Untersuchungen zeigten dann:

Die Synthesefähigkeit für α_1 -Antitrypsin wird ähnlich

wie alle anderen Funktionsproteine nach den von Mendel aufgestellten Gesetzen vererbt (Eriksson 1964/65, Küppers 1964)

Durch die Anwendung der Stärkegelelektrophorese in saurem Milieu, verbunden mit der AAKE, erkannte man die Heterogenität des α_1 -Antitrypsins und damit verschiedene Phänotypen (Küppers 1971), nach denen ein genetisches Modell mit mehreren Allelen an einem Locus konstruiert wurde. Fagerholm und Brand 1965 nannten dieses Modell das Proteinase-Inhibitor-System.

Es bedeutet: PI^M ist das normale Gen

PI^Z ist das Mangelgen (die α_1 -Antitrypsinkonzentration bei Homozygotie PI^Z/PI^Z beträgt ca. 10% vom Normalwert)

Die großen Buchstaben kennzeichnen den Phänotyp.

M/M ist der Phänotyp für den homozygoten, normalen Genotyp PI^M/PI^M (ungefähr 250 mg% α_1 -Antitrypsin).

Bis heute sind durch die Anwendung der Stärkegelelektrophorese und AAKE elf verschiedene, codominante Allele, d.h. elf Varianten des α_1 -Antitrypsinmoleküls, und 21 unterscheidbare Phänotypen gefunden worden (Fagerholm 1967/1968). Die verschiedenen Allele wurden mit großen Buchstaben bezeichnet. Die Nomenklatur richtet sich nach der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld.

Die Häufigkeit der Genotypen ist unterschiedlich. PI^M ist immer am häufigsten (0.86 - 0.99), die anderen Varianten liegen in einem wesentlich geringeren Prozent-

satz vor.

PI^D	0.023
PI^Z	0.016
PI^F	0.014

Diese Zahlen errechnete Fagerholm 1967 bei einer Gruppe von 2830 Norwegern. Mit diesen Ergebnissen stimmen auch die Untersuchungen von Küppers 1964, Eriksson 1965 bei anderen Völkern überein.

Interessant in diesem Zusammenhang mag die Auswertung bei einer Gruppe von Spaniern $PI^S = 0.112$ und Portugiesen $PI^S = 0.114$ (Fagerholm und Tenfjord 1968) sein. PI^S trat im Vergleich zu den Norwegern fünf mal häufiger auf. Im Gegensatz dazu konnte bei 68 Tibetaner (Fagerholm 1969) und bei 90 Koreaner überhaupt kein PI^S nachgewiesen werden.

Zur eindeutigen Festlegung der Phänotypen reicht die Bestimmung der Serumkonzentrationen von α_1 -Antitrypsin nicht aus, da sich die Schwankungsgrenzen teilweise überlappen. Um eine genaue Zuordnung zu ermöglichen, ist unbedingt die Anwendung der zweidimensionalen AAKE notwendig.

Die nachfolgende Tabelle soll zeigen, in welchen Größenordnungen sich die einzelnen Phänotypen bewegen. Die von Liebermann 1972 gefundenen Mittelwerte stammen von Patienten mit verschiedenen Diagnosen, sie können daher nur mit Einschränkung auf die gesunde Bevölkerung bezogen werden. Die Tabelle wird jedoch deshalb angegeben, weil auch in der vorliegenden Arbeit Patienten mit unterschiedlichen Diagnosen untersucht wurden.

PI	Zahl d. Pat.	STIK (U) Mittelw. $\pm$ mittl.Fehl.	α_1 -At mg%
ZZ	38	0.192 $\pm$ 0.051	45 $\pm$ 8.3
SZ	20	0.504 $\pm$ 0.098	106 $\pm$ 34
SS	5	0.682 $\pm$ 0.110	149 $\pm$ 23
MZ	118	0.730 $\pm$ 0.141	164 $\pm$ 44
FZ	1	0.632	120
FS	1	0.883	155
MS	71	0.970 $\pm$ 0.170	215 $\pm$ 47
IM	2	0.825 / 1.065	233 / 240
MP	5	0.987 $\pm$ 0.235	231 $\pm$ 83
FM	6	1.261 $\pm$ 0.689	264 $\pm$ 65
MM	250	1.194 $\pm$ 0.244	286 $\pm$ 73

5. Physiologische und pathologische Verhältnisse

Es wurde bereits erwähnt, daß die genaue physiologische Funktion des α_1 -Antitrypsin und der restlichen Proteinaseninhibitoren noch nicht bekannt ist. Es kann jedoch angenommen werden, daß die PI eine regulierende Aufgabe im Gleichgewicht zwischen den proteolytischen Enzymsystemen im Blut und Gewebe haben. So läßt die Hemmwirkung gegen Thrombin und Plasmin (Rimon 1966) auf seine Be-

deutung bei Blutgerinnung und Fibrinolyse schließen. Durch die Aktivität gegen das Kallikrein-Kinin-System wird eine Beziehung zu Vorgängen der Vasodilatation und Konstriktion hergestellt. Auch dürfte α_1 -Antitrypsin eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung von Leukozytenproteasen (Küppers und Bearns 1966) und anderen proteinspaltenden Enzymen (Trypsin, Chymotrypsin etc.) spielen. Man konnte auch zeigen, daß α_1 -Antitrypsin Pankreaselastase (Turino 1969) und Kollagenasen aus der Haut des Menschen (Pierce 1969) zu hemmen vermag; was evtl. bei der Entstehung eines chronisch obstruktiven Lungemphysems von Bedeutung sein könnte.

Im Verlauf der einzelnen Untersuchungen wurden während verschiedener physiologischer und pathologischer Vorgänge veränderte α_1 -Antitrypsinspiegel angetroffen. Man fand stark erhöhte Serumkonzentrationen bei:

metastasierenden Tumoren (Eriksson 1955)

akuten Entzündungen (Ascoli und Bezzola 1903)

Schwangerschaft bis zum doppelten Wert (Ganrot 1967.

Gräfenberg 1909)

Einnahme von Ovulationshemmern (Laurell et al. 1968)

frisch operierten Patienten

i.v. Injektion von Typhusimpfstoff (Küppers 1968 b)

Der Versuch wurde bei drei Phänotypen durchgeführt:

1. PI^M/PI^M der STIK-Wert stieg in 3-4 Tagen um fast 100%

2. PI^M/PI^Z beim heterozygoten Phänotyp
gab es eine Erhöhung bis in
den Normalbereich
3. PI^Z/PI^Z beim Mangelserum war nur eine
geringe Erhöhung zu erkennen

Das wichtigste Argument für die bedeutende physiologische Rolle des α_1 -At ist die Verbindung von Mangelzuständen mit bestimmten Krankheiten.

Das Interesse an der physiologischen Bedeutung von α_1 -Antitrypsin nahm sprunghaft zu, als Laurell und Eriksson 1963/65 die Beobachtung machten, daß niedrige α_1 -At-Konzentrationen mit COLF in Verbindung standen. Bei 33 Patienten des Phänotyps PI^Z/PI^Z zeigten 23 eindeutige Anzeichen von COLF. Beim Mangelstadium betrugen die Konzentrationen an Serum- α_1 -At etwa 10% vom Normalwert. Andere Autoren (Talamo 1968, Liebermann 1969, Küppers 1964) konnten dieses Ergebnis voll bestätigen.

Die Häufigkeit des Mangelsens beträgt bei 100 Patienten 0.075 (Küppers 1969), d.h. die Wahrscheinlichkeit von Homozygoten liegt deshalb bei 0.0056. Die mittleren α_1 -At-Konzentrationen werden wie folgt angegeben (Tarkoff 1968):

M/M	212 ± 32 mg
Heterozygot	119 ± 46 mg
Z/Z	25 ± 6 mg

Andere Verfasser (Jacobsson 1953, Eriksson und Laurell 1963) konnten zeigen, daß 1 ml normales Serum etwa 1.2 mg Trypsin

zu hemmen vermag (nur ca. 90% der STIK entfallen auf α_1 -At).

Seit der Erkenntnis des Zusammenhanges zwischen α_1 -At-Mangel und COLE wurde dieser Mangelzustand bei mehreren Familien gefunden und untersucht (Briscoe 1966, Eriksson 1964). Dabei erwies sich, daß dieser Mangel vererbbar ist, daß aber nicht jeder Mangelzustand mit COLE assoziiert sein müsse (Eriksson 1965, Küppers 1966). Bei Patienten mit chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen wurde bei 1-2% ein α_1 -At-Mangel eruiert (Tarkoff 1968, Küppers und Bearn 1966, Laurell und Eriksson 1963).

Charakteristisch für COLE, bedingt durch α_1 -Antitrypsinmangel, scheint folgendes klinisches Bild zu sein:

früher Beginn im 3.-4. Jahrzehnt. Der jüngste Patient war ein 18 Monate altes Mädchen (Talamo 1968)

Männer und Frauen gleich häufig betroffen

Mangel an Husten und Sputum zu Beginn der Krankheit
progressive Dyspnoe bei Anstrengungen

panacinäres Emphysem in den unteren Teilen der Lunge
die Ursache für die Erscheinung, daß
die emphysematösen Zerfallserscheinungen auf die unteren Teile der Lunge beschränkt sind, liegt nach Welch 1969 in der Tatsache begründet, daß das Blut in den unteren Teilen der Lobuli schneller fließt, so daß es hier zu Anhäufungen von

weißen Blutkörperchen kommen kann.

Noch weiß man allerdings nicht, wie α_1 -At-Mangel für COLE empfänglich macht. Außerdem ist die Krankheit nicht von Geburt auf vorhanden, sondern entwickelt sich erst im Laufe des Lebens. Es gibt zwei Theorien, die das Entstehen eines Lungenemphysems durch α_1 -At-Mangel erklären.

1. Eriksson 1964, Klüppers und Bearn 1966

Die menschliche Lunge besitzt im Gegensatz zur Rinderlunge (Astrup 1952) keine organspezifischen Inhibitoren. Sie ist auf die Hemmstoffe des Blutes angewiesen. Durch das Fehlen des proteasehemmenden α_1 -At wird die Zerstörung von Lungengerüst und Alveolargewebe durch leukozytäre Proteasen von Granulozyten und Makrophagen ermöglicht. Janoff 1970 fand, daß polymorphkernige Leukozyten proteolytische Aktivität gegen elastisches Gewebe aufweisen, daß sie Basalmembranen andauen, und daß Humanserum diese Proteasenaktivität zu hemmen vermag. Gestützt wird diese Theorie durch die Versuche von Gross 1966, dem es gelungen war, durch intratracheale Injektion von Papain, bei Ratten ein histologisches Bild zu erzeugen, das dem des chronisch obstruktiven Lungenemphysem weitgehend entsprach.

2. Hunter und Mitarbeiter 1968 gehen von einem veränderten Metabolismus der extrazellulären Kollagenfasern in der Lunge mit zunehmendem Alter aus. Abbau und Ersatz der Fasern weisen eine negative Stoffwechselbi-

lanz auf. Der elastische Zug bleibt in gleichem Maße bestehen, dadurch kommt es zur Vergrößerung der Alveolen. α_1 -At soll bei dieser Anschauung den Abbau der Kollagenfasern vergrößern und so zur Emphysembildung führen.

Ebenso wie über die Funktion besteht auch über die Art des Gendefektes, wenn ein solcher überhaupt vorhanden sein sollte, noch Unklarheit. Das durch das Mangelgen induzierte Protein unterscheidet sich vom Normalen in seiner langsameren elektrophoretischen Beweglichkeit. (Laurell 1965) Es ist nicht geklärt, ob die langsamere Wanderungsgeschwindigkeit durch Strukturdifferenz der Proteine (Fagerholm und Laurell 1967) entstanden ist, oder ob es zur Reaktion mit unbekannten Substanzen, und damit zur Komplexbildung gekommen ist. Bei der gebundenen Form kann es sich nicht um einen α_1 -At-Trypsin-Komplex handeln (Laurell 1965 a). Das Molekulargewicht des gebundenen Stoffes liegt nämlich bei 20000 (Trypsin hat ein MG von 24000). Die Bindung zwischen den beiden Komponenten ist ziemlich stark. Das Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß das α_1 -Antitrypsin im Plasma und/oder in der intrazellulären Flüssigkeit auch eine Transportfunktion ausüben könnte. Laurell 1965 a gibt eine weitere Möglichkeit an, die auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit durchaus in Betracht zu ziehen ist. Er vermutet zwei Arten von α_1 -Antitrypsin, die im Verhältnis 5 : 1 im Serum enthalten sein müßten. Beim Mangel-

patienten sollte danach die normale Komponente fehlen, oder nur in winzigen Mengen vorhanden sein. Diese Theorie scheint durchaus denkbar zu sein. Auch dieser Arbeitskreis konnte zwei Arten von α_1 -At ausfindig machen. Sie unterscheiden sich jedoch bei den von uns gewählten Versuchsbedingungen nicht durch die Wanderungsgeschwindigkeit, sondern durch die unterschiedliche Affinität zu Trypsin.

Wie Küppers 1968 b bei i.v. Injektion von Typhusimpfstoff zeigen konnte, dürfte das Mangelgen für die niedrige Syntheserate, die Synthese erfolgt wahrscheinlich ausschließlich in der Leber (Schultze et Heremans 1966), verantwortlich sein. Der Versuch ist aber kein Beweis dafür. Das Zustandekommen des α_1 -At-Mangels durch erhöhte Ausscheidung in der Niere wird durch die Untersuchung von Küppers und Fallat 1969 widerlegt. Bei Ermittlung der Plasma-Clearance mit Jod¹²⁵ markiertem α_1 -Antitrypsin stellen sie fest, daß die Abbauraten des normalen, des heterozygoten und des Mangelgens in der gleichen Größenordnung liegen. Die Halbwertszeit der drei Varianten beträgt etwa drei bis vier Tage.

Eine weitere Möglichkeit, die den verminderten α_1 -At-Serumspiegel erklären könnte, wurde vor kurzem von Sharp 1971 aufgezeigt. Er berichtet von einer infantilen Leberzirrhose, die mit α_1 -At-Mangel verbunden ist. Bei Überprüfung der übrigen Familienmitglieder konnten keine Anzeichen für COLE angetroffen werden. Bei Lebersektion dieser

Patienten (Zirrhose und α_1 -Antitrypsinmangel) stellte er Anhäufungen von α_1 -At in den Leberzellen fest. Die Transplantation einer gesunden Leber erbrachte innerhalb von achtundvierzig Stunden normale α_1 -Antitrypsinwerte.

Sharp stellte deshalb die Vermutung auf, daß das in der Leber synthetisierte α_1 -At nicht aus den Leberzellen transportiert werden könne. Der α_1 -At-Mangel resultiert nach dieser Theorie nicht von einer verminderten Syntheserate, sondern könnte auch durch einen geringeren transzellulären Transport entstanden sein.

Ob diese Genese auch bei chronisch obstruktiven Lungenemphysem zutreffen kann, muß sich an Hand weiterer Arbeiten herausstellen. Bis zu diesem Zeitpunkt ist die Leber von Probanden mit COLE, bedingt durch α_1 -At-Mangel, noch nicht nach diesen Gesichtspunkten betrachtet worden.

Die Meinungen und Untersuchungsergebnisse über den Zusammenhang zwischen COLE und Heterozygotie gehen im Augenblick weit auseinander.

Welch et al. 1969, Fagerholm und Haug 1969, Talamo 1968 verneinen das Vorhandensein eines Zusammenhanges.

Liebermann und Mittmann 1969, Küppers 1969 haben eine erhöhte Anfälligkeit für COLE bei heterozygoten Individuen nachweisen können.

Liebermann 1969 hatte erklärt, daß der homozygote Mangelzustand Z/Z und der heterozygote Zustand außer zum COLE auch zu peptischen Ulzera neigen.

Um Klarheit über die Assoziation von COLE und Heterozy-

gotie zu erhalten, sind unbedingt weitere Untersuchungen abzuwarten. Es ist dabei äußerst wichtig, daß zur Festlegung vom heterozygoten Stadium eine Antigen-Antikörper-Kreuz-Elektrophorese vorgenommen wird. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt gezeigt, reicht die Bestimmung der STIK nicht aus, um eine eindeutige Zuordnung zu den jeweiligen Phänotypen zu machen.

Spezieller Teil

Theoretische Auswertung

1. Ergebnisse

a) Künstliche Komplexierung

Behandelt man Serum mit steigenden Mengen Trypsin, und untersucht es im Hemmtest, so tritt parallel zur zunehmenden Trypsinkonzentration ein Abfallen der Hemmkapazität (freies a_1 -Antitrypsin) bis zur vollständigen Entfernung jeglicher Inhibitionsfähigkeit auf. Bei immunoelektrophoretischer Auswertung beobachtet man das Auftreten und Anwachsen eines kathodenwärts verschobenen Präzipitationsgipfels. In gleichem Maße wie die Fläche des zweiten Peaks wächst, verringert sich die Fläche des auf a_1 -At entfallenen Gipfels bis auf einen nicht mehr entfernbaren Rest (Abb.1-3). Wir folgern daraus, daß der neuentstandene Gipfel durch Anlagerung des Trypsins an das freie a_1 -At entstanden ist. Um diesen Schluß beweisen zu können, mußte selektiv freies a_1 -At aus einem Serum mit Doppelgipfel entfernt werden. Dazu wurde das in diesem Arbeitskreis auf CM-Cellulosebasis hergestellte, unlösliche Trypsinharz verwendet (Hochstrasser 1973). Bei 15 minütiger Inkubation von Serum mit Trypsinharz (auf 1 ml Serum etwa 300 mg Harz) verschwand die Hemmwirkung des Serums bis auf eine Resthemmkapazität von annähernd 10 % (dafür sind die fünf restlichen im Serum enthaltenen Proteasenin-

hibitoren verantwortlich).

Hochstrasser 1973 konnte an Hand der zweidimensionalen Simultanelektrophorese zeigen, daß das Harz selektiv freies a_1 -At aus dem Serum entfernt, ohne dabei die anderen Serumproteine zu verändern. Daß diese spezifische Selektivität auch bei der Entfernung von freiem a_1 -At aus komplexhaltigen Seren (Serum mit Doppelgipfel) gewährleistet ist, soll der nächste Versuch beweisen.

b) Nachweis der spezifischen Selektivität des Harzes

aa) Serum mit künstlich hergestelltem Komplex

Durch Zugabe von Trypsin zu einem Serum, das nur freies a_1 -At enthält, wird komplexhaltiges Serum erzeugt. Die zu verwendende Trypsinmenge wird errechnet. Man setzt gerade soviel ein, daß ca. 10% des freien a_1 -At gebunden wird. Ein Teil des auf diese Weise erhaltenen komplexierten Serums wird der Harzbehandlung unterzogen. Von beiden Teilen des Serums wird nun ein Pherogramm angefertigt. Das Ergebnis ist in Abb. 4+5 zu sehen. Die Gipfel-
flächen, die auf die Komplexverbindung entfallen, sind in beiden Pherogrammen in etwa gleich. Die Fläche des Gipfels, der auf das freie a_1 -At entfällt, ist nach Harzbehandlung stark erniedrigt. Die Trypsincellulose bindet somit selektiv freies a_1 -At, ohne die Komplexverbindung zu beeinflussen.

ab) Serum mit natürlichem Komplex

Die gleiche Versuchsanordnung wie in aa) beschrieben, wurde mit Seren von Patienten mit verschiedenen Krankheitsbildern (Sinusitis, akuter Peritonealabszeß, andere Infektionen mit massiver Leukozytose), die einen α_1 -At-Proteasen-Komplex erwarten ließen, wiederholt.

Bei 105 untersuchten Patienten konnte nur in neun Fällen ein komplexhaltiges Serum gefunden werden. Das relativ seltene Auftreten eines Komplexes wird durch einen Versuch von Ohlsson 1971 bestätigt, bei dem nach Absetzen einer Trypsindauerinfusion die Komplexverbindung rasch aus dem Blut verschwand.

Das Ergebnis der Pherogramme stimmt mit dem Resultat überein, das bei Verwendung von künstlich komplexierten Seren erhalten wurde. Abb. 5 zeigt weiter, daß bei Erhöhung der zur Elektrophorese eingesetzten Serummenge eine Auswertung des α_1 -At-Komplexes, mit Hilfe einer Eichkurve (Hochstrasser 1972), möglich sein müßte.

c) Auftreten von α_1 -Antitrypsin mit unterschiedlicher Affinität zu Trypsin

Wie bereits früher erwähnt wurde, läßt sich das freie α_1 -At nicht restlos durch Harzbehandlung entfernen. Es lag deshalb die Vermutung nahe, daß im Serum

zwei Arten von α_1 -Antitrypsin (Laurell 1965 a) vorkommen, die sich auf Grund ihrer Affinität zu Trypsin unterscheiden. Um dies zu klären, wurde das gesamte freie α_1 -At durch Mischen mit leicht überschüssigen Mengen Trypsin (105% ig) komplexiert. Die vollständige Komplexbildung wurde mittels photometrischer Messung der verbliebenen Hemmkapazität geprüft. Anschließend fertigt man von den trypsingesättigten Seren ein Pherogramm an. Abb. 6+7

In allen Fällen konnte immunologisch noch aktives, freies α_1 -At festgestellt werden, obwohl im Hemmtest kein freies α_1 -Antitrypsin mehr vorhanden war. (In einigen Pherogrammen haben sich die Gipfel des freien α_1 -At und der Komplexverbindung überlagert, so daß eine exakte Differenzierung unmöglich war. Durch Veränderung der Elektrophoresebedingungen, wie Laufdauer, Spannung, aufgetragene Serummenge, traten beide Peaks wieder auf). Abb. 8-10

Zu diesen Ergebnissen passen auch die mittels Partigenplatten errechneten α_1 -At-Konzentrationen des Serums. Diese Werte lagen wesentlich höher als die Werte, die im Hemmtest bestimmt wurden. Abb. 11+12

Der Mittelwert der STIK aller untersuchten Seren ergab 1343 mU/ml. Die α_1 -At-Konzentrationen, die mit Hilfe der radialen Immunodiffusion ermittelt wurden, lag durchschnittlich bei 2140 mU/ml. Die inhibitorische

Hemmfähigkeit des Serums beträgt somit im Durchschnitt 63% der gesamten α_1 -At-Konzentration (lediglich 90% der STIk entfallen auf α_1 -At).

- d) Vergleichende kinetische Betrachtung von Humanserum mit normalen α_1 -Antitrypsinkonzentrationen und Mangelseren

Durch Entfernung von freiem α_1 -At aus normalen Seren mit Hilfe des Trypsinharzes gelingt es, Serum- α_1 -Atkonzentrationen zu schaffen, die größenordnungsmäßig im Bereich der Mangelkonzentrationen (750 mg%) liegen. Man hat dadurch die Möglichkeit einen enzymkinetischen Vergleich zwischen Normalserum, künstlich hergestelltem Mangelserum und natürlich vorkommendem Mangelserum anzustellen. Das Mangelserum stammte von einem Patienten mit COLE.

Aus den Diagrammen der Abb. 13-15 geht hervor, daß enzymkinetisch zwischen dem Normalserum und den beiden anderen Seren ein Unterschied vorhanden ist. Der Kurvenverlauf der beiden Mangelseren stimmt weitgehend überein. Ihre Endhemmungen sind, wie aus nachstehender Tabelle ersichtlich, fast identisch.

Für die Tatsache, daß bei den Kurven der 3 untersuchten Seren mit zunehmendem Serumgehalt eine Dissoziation des α_1 -At-Trypsin-Komplexes erfolgt (die Kurve steigt an), gibt es keine Erklärung. Theoretisch käme eine Substrat- oder Produkthemmung in Betracht.

Ob und inwieweit dies zutrifft, und welche physiologische Rolle dieses Phänomen in vivo spielt, muß an weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Bapna	Normalser. %	harzbeh.Ser. %	Mangelser. %
1 ml (2 g/l)	78	43	52
1 ml (1 g/l)	81	63	56
0.5 ml (")	83	68	73
0.25ml (")	89	84	82

Abb. 16 Endhemmungen der Seren bei versch. Substratkonzentrationen (Bapna) in Prozent

Ebenso reicht die enzymkinetische Ähnlichkeit von natürlichen und künstlichen Mangelserum nicht aus, um gültig sagen zu können, daß sich die Proteinmoleküle strukturell nicht unterscheiden (Küppers 1968 b, Sharp 1971¹⁾. Aufklärung kann erst die chemische Analyse geben.

Abb. 1-10 Zweidimensionale Immunelektrophorese von Humanserum; Anti- α_1 -Antitrypsin in 3 ml Präzipitationsgel

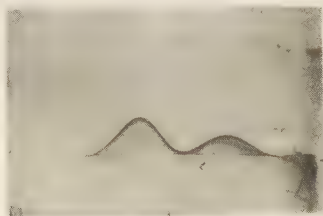
1 = α_1 -Antitrypsin

2 = komplexiertes α_1 -Antitrypsin



Abb. 1

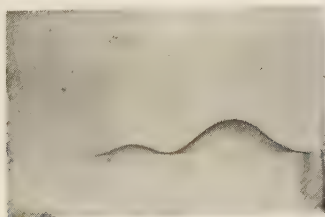
Immunelektrophorese von Humanserum A



↑₁ ↑₂

Abb. 2

Immunelektrophorese von Humanserum A nach Komplexbildung von 50% des α_1 -At mit Trypsin



↑₁ ↑₂

Abb. 3

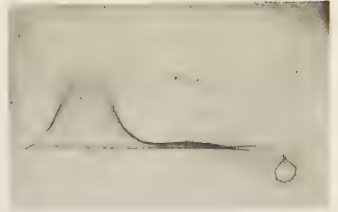
Immunelektrophorese von Humanserum A nach Komplexbildung von 90% des α_1 -At mit Trypsin



↑₁ ↑₂

Abb. 4

Immunelektrophorese von Humanserum B nach Komplexbildung von 10% des α_1 -At mit Trypsin



↑₁ ↑₂

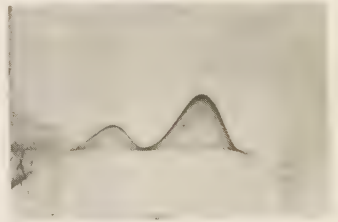
Abb. 5

Immunelektrophorese von Humanserum B nach Komplexbildung von 10% des α_1 -At mit Trypsin und nachfolgender Behandlung mit Trypsinharz



Abb. 6

Immunelektrophorese von Humanserum C



↑₁ ↑₂

Abb. 7

Immunelektrophorese von Humanserum C nach Komplexbildung von 100% des α_1 -At mit Trypsin



Abb. 8

Immunelektrophorese von Humanserum D

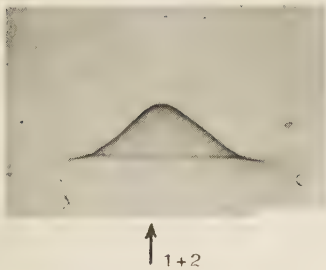


Abb. 9

Immunelektrophorese von Humanserum D nach Komplexbildung des gesamten α_1 -At mit Trypsin

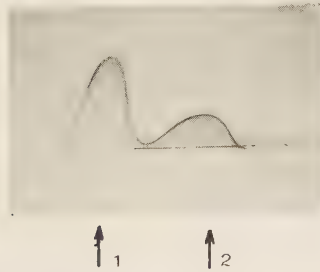


Abb. 10

Immunelektrophorese des Serums von Abb. 9 mit veränderten Elektrophoresebedingungen

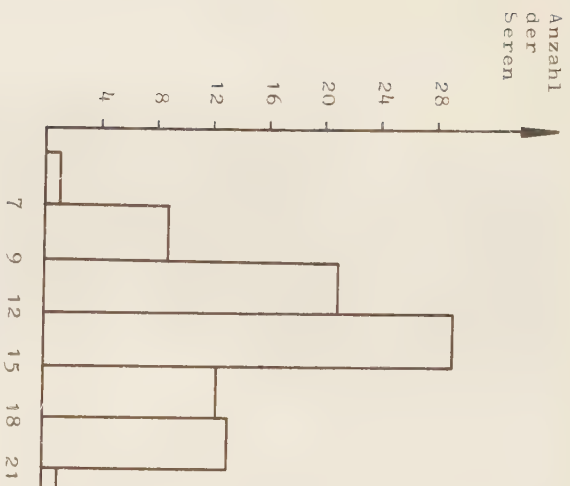


Abb. 11 Verteilung der im Hemmtest
(Hydrolyse von Bapna) bestimmten
STIK von 84 Seren

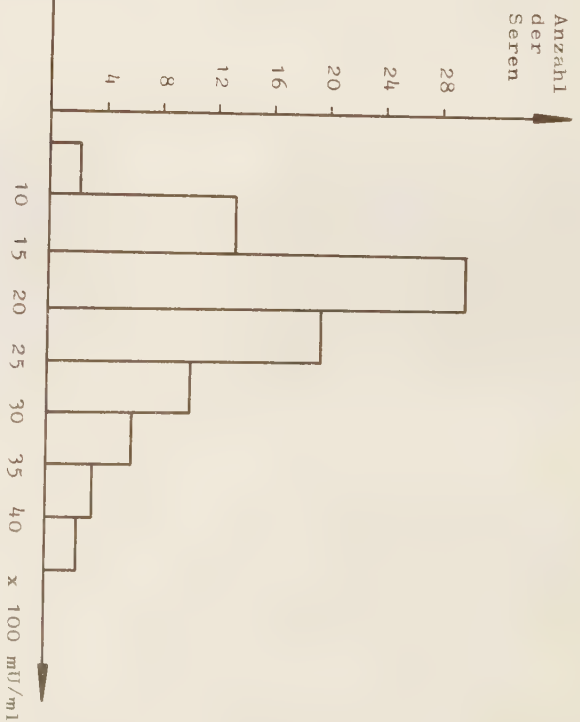


Abb. 12 Verteilung der durch radiale Immunodiffusion
errechneten a_1 -At-Konzentration der
gleichen Seren wie in Abb. 11

Abb. 13 - 15 Bestimmung der Endhemmungen von 3 Seren bei verschiedenen Substratkonzentrationen

————— 2 fache Konzentration
 - - - - - 1 " "
 - . - . - 1/2 " "
 1/4 " "

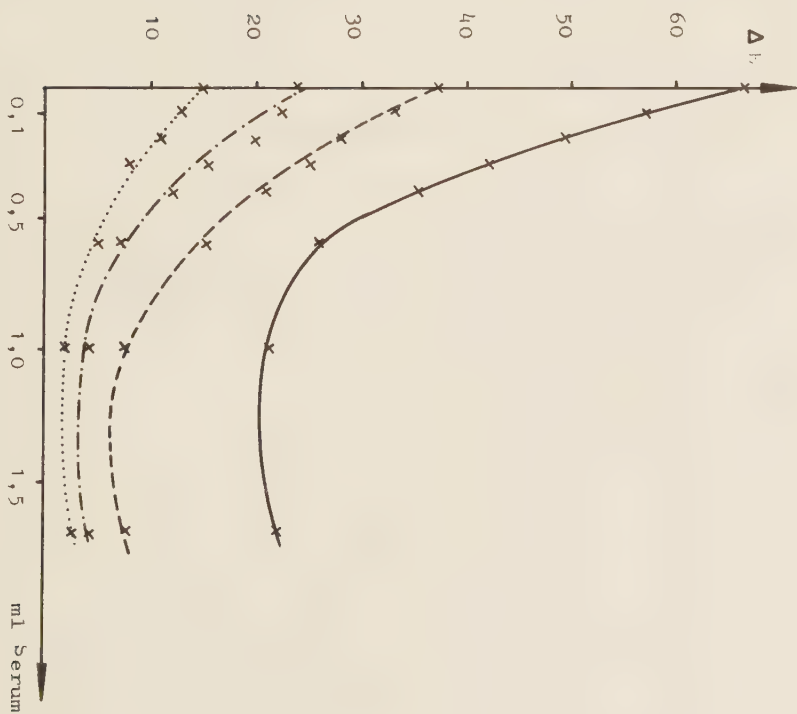


Abb. 13 unbehandeltes Normalserum

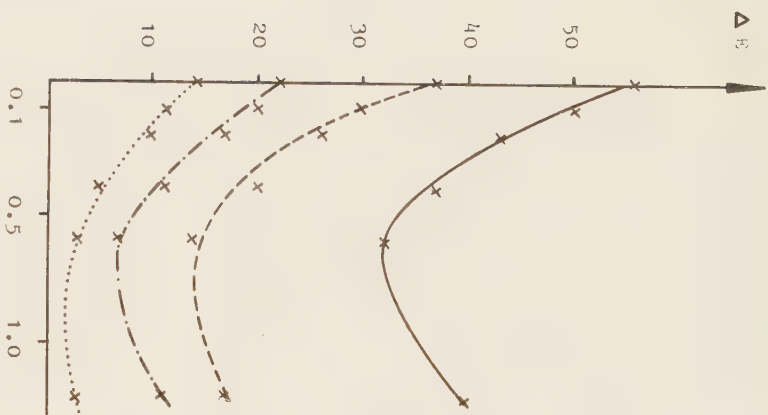


Abb. 14 Normalserum harzbehandelt

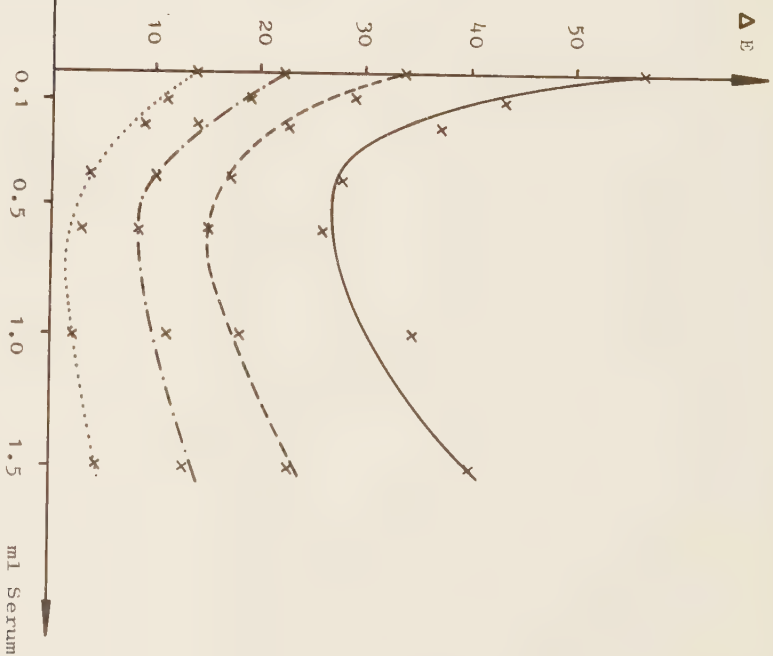


Abb. 15 Mangelserum (Lungenemphysem)

2. Diskussion der Ergebnisse

Als Laurell und Eriksson 1963, 1965 den Zusammenhang zwischen hereditärem α_1 -Antitrypsinmangel im Serum und chronisch obstruktivem Lungenemphysem erkannt hatten, war auch die bedeutende physiologische Funktion des α_1 -At entdeckt. Es stellt einen wichtigen Inhibitor für freiwerdende Proteasen aus zerfallenen Leukozyten und Bakterien dar. Dabei unterscheiden sich, nach vergleichenden kinetischen Betrachtungen, das α_1 -At von gesunden Patienten nicht von dem α_1 -At, das bei vererbtem Mangel auftritt. Dieses Ergebnis wird durch Versuche mit Jod¹²⁵ markiertem, gereinigtem α_1 -At (Küppers 1969) gestützt. Die geringere Beweglichkeit im elektrischen Feld (Axelson 1965) könnte aber auch auf einen Strukturunterschied des α_1 -At-Moleküls hinweisen. Genaue Aufklärung über den strukturellen Aufbau des α_1 -At-Moleküls kann letzten Endes erst die chemische Analyse ergeben.

Das Entstehen von Bronchioektasien wurde ebenfalls auf eine zu geringe α_1 -At-Konzentration im Serum zurückgeführt, obwohl bei α_1 -At-Mangel nicht in jedem Fall Bronchioektasien auftraten. Hochstrasser 1971, 1972 konnte diesen Umstand erklären, als er im Bronchialsekret einen niedermolekularen Inhibitor fand, der die gleiche hemmende Wirkung wie α_1 -At zeigte. Der neue Hemmstoff war unabhängig von der α_1 -At-Konzentration immer in gleichen Mengen vorhanden (Hochstrasser und Reichert 1972).

Wenngleich durch das Auffinden dieses niedermolekularen Inhibitors die Bedeutung von α_1 -Antitrypsin für die Pathophysiologie im oberen Respirationstrakt eingeschränkt wurde, spielt es im Kreislauf weiterhin eine gewichtige Rolle. Man denke einmal an seine Wirkung auf Thrombin und Plasmin (Rimon 1966), und damit auf den Gerinnungsmechanismus des Blutes. Zum anderen darf die Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems durch lysosomale Proteasen, ohne ausreichenden Inhibitorschutz, nicht vergessen werden. Durch Infusion von Trypsin oder Kallikrein können tödliche Schockzustände auftreten (Ohlsson 1971).

Ähnliche Vorgänge dürften beim gehäuften Auftreten und Zerfall von Leukozyten eine Rolle spielen, wo im Serum mit dem Auftreten von α_1 -Antitrypsin-Proteasen-Komplexen zu rechnen ist. Im Verlauf der vorliegenden Untersuchungen konnten diese Komplexverbindungen bei verschiedenen Entzündungsvorgängen nachgewiesen werden. Das überraschend seltene Auftreten von Komplexen läßt sich zum Teil durch die Beobachtung erklären, daß der α_1 -At-Trypsin-Komplex eine relativ kurze Halbwertszeit besitzt (Ohlsson 1971). Durch die Harzbehandlung ist eine Möglichkeit geschaffen worden, die Menge des komplexierten α_1 -At (Aufstellen einer Eichkurve), und daraus den Grad des Zellzerfalles, festzustellen. Dieser kann als Maß für die Stärke der ablaufenden Entzündung gesehen werden.

Die Bedeutung des Auftretens zweier Arten von α_1 -At für den Organismus ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht über-

schaubar. Eine Erklärung für die geringere Adsorbierbarkeit könnte darin liegen, daß das im Serum verbleibende a_1 -At eine höhere Dissoziationskonstante besitzt, so daß es unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht zur Komplexbildung kommt.

Die Tatsache, daß der a_1 -At-Spiegel bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Zuständen erhöht ist, scheint im Widerspruch zum Verbrauch bei Komplexbildung zu stehen. Der vermehrte Verbrauch an a_1 -At könnte durch eine gesteigerte Produktion in der Leber überschießend kompensiert werden.

Die Schwierigkeiten einer objektiven Auswertung liegen in der niedrigen Halbwertszeit, und damit in der Auffindbarkeit des Komplexes überhaupt. Um einen diagnostischen Aussagewert zu erreichen, müssen die an den Komplexbindungen beteiligten Proteasen identifiziert werden, außerdem muß geklärt sein, aus welchen Geweben sie stammen. In diesem Sinn sind unbedingt weitere Untersuchungen anzustellen.

Experimentelle Durchführung

1. Material

a) Liste des verwendeten Materials

Photometer nach Eppendorff

Küvetten mit $d = 1$ cm, Inhalt ca. 3.5 ml

N^a - Benzoylarginin - D_L - 4Nitroanilid von E. Merck

Trypsin vom Rind, behandelt mit N - Tosyl - L - phenyl-
alanin - chlormethan

Radialdiffusionsplatten, Behringwerke

Agarose, Behringwerke

Anti - a₁ - Antitrypsinserum vom Kaninchen, Behringwerke

Trypsin polymer gebunden an CM - Cellulose, hergestellt
aus CM - Cellulosehydrazid (E. Merck) und Tryp-
sin nach einer Vorschrift von E. Merck, Darm-
stadt. Genaue Herstellungsanleitung siehe
Hochstrasser 1973.

Mischpuffer 0.4 mol/l Tra-P + 0.6 mol/l NaCl pH= 7.8

Triäthanolamin - HCl - Puffer

Filterpapier

Pipetten verschiedener Größe

Elektrophoresesystem Boskamp

Zentrifugenschleuder

b) Gewinnung der Seren

Es wurden Seren von Patienten mit verschiedenen physiologischen und pathologischen Diagnosen untersucht. Das Blut stammte von klinisch gesunden Probanden, von frisch operierten und von Patienten mit akuten Infekten mit massiver Leukozytose.

Das Blut wurde ohne gerinnungshemmenden Zusatz am morgen aus der Armbeugevene entnommen. Es wurde 15 Minuten bei einer Temperatur von -4° Grad Celsius (um einer Hämolyse vorzubeugen) im Kühlschrank belassen und dann mit ca. 3500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und anschließend sofort verarbeitet.

2. Methoden

a) Bestimmung der Serumhemmkapazität

Die Hemmwirkung der Seren gegen Trypsin wurde anhand der Verminderung der Hydrolysegeschwindigkeit von N^a -Benzoylarginin-4-Nitroanilid durch Trypsin in Standardansätzen bestimmt (Fritz 1970).

Der Leerwert (ohne Serum) wurde mit einer Trypsinstammlösung täglich neu nach folgendem Ansatz im Eppendorff, Hg-Filter 405 nm, ermittelt:

man pipettiert	0,200 ml Trypsinstammlösung
	1,800 ml Tra-Puffer
	1,000 ml Bapna

in eine Küvette, durch Umrühren versucht man eine

gleichmäßige Verteilung zu erzielen. Anschließend wird am Photometer bei konstanter Temperatur = 25 Grad Celsius die Extinktionsänderung pro Minute abgelesen. Aus vier Werten wird der Mittelwert errechnet und als Leerwert zu Grunde gelegt. Er lag bei dem Ansatz bei $E_L = 33/\text{min}$.

Zur Serumtrypsininhibitorkapazität-Bestimmung (STIK) wurde folgendermaßen vorgegangen.

Für den Ansatz x ml Serumverdünnung
 0,200 ml Stammtrypsinlösung
 1,800 - x ml Tra-Puffer
 1,000 ml Bapna

wurde erneut die Extinktionsänderung/Min (E_S) bei 25 Grad gemessen.

Aus der Differenz $E_L - E_S$, einem Korrekturfaktor (3.33), der jeweiligen Serumverdünnung, und der eingesetzten Serummenge läßt sich nun die STIK ausrechnen.

Es erwies sich als günstig, das Serum um das 10fache mit Mischpuffer zu verdünnen, und 50 bzw. 100 ul Serumverdünnung zum Hemmtest einzusetzen.

Beispiel

100 ul Serumverdünnung (10fach) ergeben

$E_S = 23$. $E_L = 33$.

Korrekturfaktor = $\frac{1}{3.33} = \frac{1}{3}$ fach

Berechnung der STIK

$$10 \times 100 \times \frac{1}{3} = 330 \text{ mU/ml}$$

b) Radiale Immunodiffusion

Eine weitere Möglichkeit die a_1 -At-Konzentration im Serum zu bestimmen gelingt mit der radialen Immunodiffusion (Mancini 1965). Dazu verwendet man Diffusionsplatten der Behringwerke. Die Auswertung erfolgt nach den Vorschriften des Herstellers.

Will man die STIK - Werte und die a_1 -At-Konzentrationen vergleichen, müssen folgende Angaben berücksichtigt werden:

aa) nur 90% der STIK entfallen auf a_1 -At

ab) $1\mu\text{g/ml } a_1\text{-At} = 0.53 \text{ mU/ml } a_1\text{-At}$

c) Herstellung von a_1 -Antitrypsin-Trypsin-Komplexen

Humanserum wird mit Puffer pH 7.8 im Verhältnis 1:1 gemischt, und die Hemmkapazität in ImU (= Inhibitormilliunits) bestimmt. Ungefähr 90% der STIK geht vom a_1 -At aus. Weiterhin vermag 1 mU a_1 -At etwa 1 μg Trypsin zu hemmen. Bei bekanntem Inhibitorgehalt des Serums ist es nun möglich, diejenige Trypsinmenge zu berechnen, die zur Überführung eines definierten a_1 -At-Anteils in die Komplexverbindung notwendig ist. Aus der Menge des zugegebenen Trypsins und der Resthemmkapazität kann die in den Komplex übergeführte Inhibitormenge berechnet werden.

Bei der Standardlösung handelte es sich um eine konzentrierte Trypsinlösung (50 mg Trypsin in 50 ml verdünnter HCl), die jeden dritten Tag erneuert werden mußte, da die Enzymaktivität rapide nachließ.

Herstellung der "105 % igen Komplexe

Das gesamte a_1 -At des Serums, das im Verhältnis 1:1 mit Mischpuffer verdünnt worden ist, wird durch Zugabe berechneter Mengen Trypsin vollständig in den Komplex übergeführt. Damit sicher das gesamte freie a_1 -At komplexiert wird, muß mit leicht überschüssigen Mengen Trypsin gearbeitet werden. Die Extinktionsänderung pro Minute mußte bei dem unten folgenden Ansatz größer Null (0 - 6) sein. Wir sprachen dann von einem "105 % igen" Komplex.

0.200 ml 105%iges Serum

1.800 ml Tra-Puffer

1.000 ml Bapna

Es stellte sich heraus, daß die tatsächlich zur Herstellung des Komplexes benötigte Menge Trypsin etwa 30 - 50 % über den rechnerisch ermittelten Werten lag.

d) Verarbeitung und Anwendung des Trypsin-, Chymotrypsin-harzes

Das im Kühlschrank (-4 Grad Celsius) gelagerte Harz wird mit einem Puffergemisch bestehend aus

1 Teil	0.4 mol Tra-P	pH = 7.8
	2.0 mol NaCl	

+ 9 Teile	0.2 mol Tra-P	pH = 7.8
-----------	---------------	----------

gewaschen, scharf abzentrifugiert (3500 Umdrehungen pro Minute) und der Überstand (Puffer) abpipettiert.

Dieser Vorgang wird 3 mal wiederholt.

Die jeweils benötigte Harzmenge wird abgewogen, mit Serumverdünnung versetzt, und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Magnetrührer gerührt. Das Gemenge wird zentrifugiert (3500 Umdrehungen/Minute) und der Überstand (Serum) abpipettiert. Um noch evtl. vorhandene Harzpartikelchen zu entfernen, filtriert man den abpipettierten Überstand durch ein Filterpapier.

Aus dem so gereinigten Serum wird am Eppendorffphotometer die Resthemmkapazität bestimmt. Ist im Serum noch Inhibitionsaktivität vorhanden, wird erneut Harz zugesetzt und der Versuch wiederholt. Eine Restkapazität von 10% läßt sich nicht entfernen. Sie stammt von den übrigen, im Serum vorhandenen Inhibitoren. Wird das Harz im Überschuß verwendet, kommt es rasch zum Abbau des freien- und des komplexgebundenen α_1 -At. Nach unseren Untersuchungen wurden pro ml unverdünntes Serum 200 - 400 mg Trypsinharz benötigt.

e) Selektive Adsorption des freien α_1 -Antitrypsin¹

aa) Serum, dessen α_1 -At durch Zugabe von Trypsin zu etwa 30% komplexiert wurde, wird mit Trypsinharz behandelt, auf 90%ige Entfernung der Hemmwirkung geprüft, zentrifugiert und gefiltert. Sowohl vom komplexierten, wie auch vom harzbehandelten, komplexierten Serum wird eine zweidimensionale Immunelektrophorese (Laurell 1965) durchgeführt.

ab) Serum, das natürlicherweise bereits einen Komplex aufweist, wird ebenfalls harzbehandelt und dann wie in aa) beschrieben weiterverarbeitet.

f) Durchführung der Elektrophorese¹

Die zweidimensionale Immunelektrophorese von α_1 -At und seinen Komplexen wird nach der von Laurell 1965 angegebenen Methode bei pH 8.0 durchgeführt. Bei diesem pH erfolgt noch keine Auftrennung der genetischen Varianten (Küppers und Bearn 1966, Fagerholm und Brand 1965, Fagerholm und Laurell 1967).

g) Erläuternde Hinweise zur vergleichenden Enzymkinetik
Untersucht werden

gesundes Serum

Serum mit α_1 -At-Mangel (Lungenemphysem)

gesundes Serum, dessen α_1 -At-Konzentrationen in den Bereich des Mangelserums reduziert wurden

1) Ich möchte mich bei meinem Kollegen K. E. Baader, der gleichzeitig im Verlauf seiner Doktorarbeit dieselben, im Verlauf dieser Arbeit angegebenen Seren, immunelektrophoretisch untersuchte, bedanken. Er stellte die Pherogramme aus seiner noch unveröffentlichten Arbeit zur Verfügung.

In das Koordinatenkreuz werden eingetragen:

Abszisse - steigende Serummengen

Ordinate - Extinktionsänderung /Min. in Abhängigkeit
der Substratmengen

1.00 ml Bapna 2 g/l = 2 fache Konz.

1.00 ml " 1 g/l = 1 " "

0.50 ml " " " = $\frac{1}{2}$ " "

0.25 ml " " " = $\frac{1}{4}$ " "

Der Ansatz zur Bestimmung der Extinktion setzt sich
wie folgt zusammen

$x_{1,2,3}$	ml Serum
0.2	ml Trypsin
$1.8 - x_{1,2,3}$	ml Tra-Puffer
1.0	ml Bapna

Die Endhemmung als theoretischer Wert berechnet sich:

$$\text{Endhemmung (\%)} = \frac{a}{\Delta E} \times 100$$

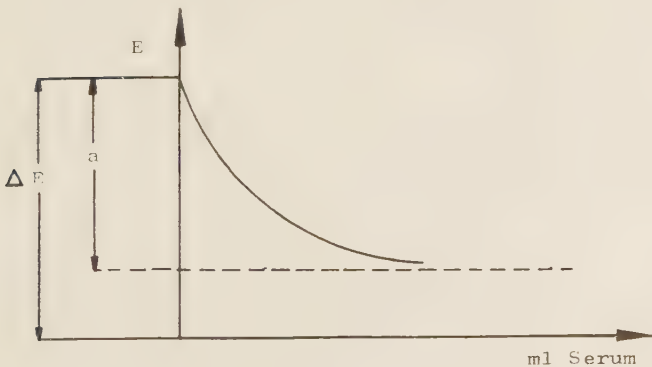


Abb. Erläuterung zur Bestimmung der Endhemmung

Literaturverzeichnis

- Ascoli, M., Bezzola, C.: Das Verhalten des antitryptischen Vermögens d. Blutserums bei der croupösen Pneumonie. Berl. klin. wscr. 40, 391-394 (1903)
- Astrup, T.: Acta Haematol. 7, 221 (1952)
- Bauer, J.: Z. Immun. Forsch. Orig. 5, 186 (1910)
- Briscoe, W. A., Klippers, F., Davis, A. L., Bearn, A. G.: A case of inherited deficiency of serum α_1 -at associated with pulmonary emphysema. Amer. Rev. resp. Dis. 94, 529-539 (1966)
- Bundv, W. A., Mehl, J. W.: Trypsin inhibitors of human serum. II. Isolation of the α_1 -inhibitor and its partial characterization. J. biol. Chem. 234, 1124-1128 (1959)
- Camus, L., Gley, E.: Action du sérum sanguin sur quelques ferments digestiv. C. R. Soc. Biol. 49, 825, (1897)
- Eisner, G.: Zschr. f. Immunitätsforschung Orig. I, 650 (1908)
- Eriksson, S.: Pulmonary emphysema and α_1 -at deficiency. Acta. med. scand. 175, 197-205 (1964)
- Eriksson, S.: Studies in α_1 -deficiency. Acta. med. Scand. 177, Suppl. 175 (1965)
- Fagerholm, M. K., Brand, M.: Serum prealbumin: Polymorphism in man. Science 149, 986-987 (1965)
- Fagerholm, M. K.: Serum PI-types in Norwegians. Acta path. microbiol. scand. 70, 421-428 (1967)
- Fagerholm, M. K., Laurell, C. B.: The polymorphism of prealbumins and α_1 -at in human sera. Clin. chem. Acta 16, 199 (1967)
- Fagerholm, M. K.: The PI-System. Genetic variants of serum α_1 -at. Series, Haematol. 1, 153-161 (1968)
- Fagerholm, M. K., Tenfjord, O. W.: Serum PI-types in some European, American, Asian and African populations. Acta path. microbiol. Scand. 72, 601-608 (1968)
- Fagerholm, M. K.: Quantitative studies on the inherited variants of serum α_1 -at. Scand. J. clin. Lab. invest. 23, 97-103 (1969)
- Fagerholm, M. K., Hange, H. F.: Serum PI-types in patients with pulmonary diseases. Acta Allergol. 24, 107 (1969)
- Ganrot, P. O., Bjerre, B.: α_1 -at und α_2 -macroglobulin concentration in serum during pregnancy. Acta obstet. gynec. scand. 46, 126-137 (1967)
- Grafenberg, J.: Antitrypsingehalt des mütterlichen Blutserums während der Schwangerschaft. Münch. med. Wschr. 56, 702-704 (1909)
- Gross, P., Pfitzer, F. A., Tolker, E., Babyak, M. A., Kaschak, M.: Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. Arch. environm. Hlth. 11, 50-58 (1966)
- Hahn, M.: Zur Kenntnis der Wirkungen des extravaskulären Blutes. Berl. klin. Wschr. 34, 499-501 (1897)
- Hedin, S. G.: J. Physiol. 30, 195 (1903/04)

- Heimbürger, N., Schwick, H.G.: Die Fibrinagar-Elektrophorese
I. Mitteilung: Beschreibung der Methode
- Heimbürger, N., Haupt, H.: Zur Spezifität der Antiproteinasen
des Humanplasmas für Elastase. klin. Wschr. 44,
1196-1199 (1966)
- Heimbürger, N., Haupt, H., Schwick, H.G.: Proteinase Inh. of Human
Plasma in Proceedings of the International Research
Conference on Proteinase Inhibitors. München Nov.
1970
- Hochstrasser, K., Schuster, R., Reichert, R., Heimbürger, N.: Nach-
weis und quantitative Bestimmung von komplexen
zwischen Leukozytenproteasen und α_1 -at in Körperse-
kret und Körperflüssigkeiten. Hoppe-Seyler's Z. Phy-
siol. Chem. 353 (1972)
- Hochstrasser, K., Reichert, R., Werle, E.: Nachweis eines niedermo-
lekularen Proteaseninhibitors im menschl. Bronchial-
sekret. Zschr. für Laryngol., Rhinol., Otolog. und Grenz-
gebiete, 3, 190-193 (1972)
- Hochstrasser, K., Hochgesand, K., Schuster, R., Baader, K.E., Pecher
Franz, Fritz, H., Heimbürger, N.: Zur selektiven Bindung
von α_1 -Antitrypsin an Trypsin- und Chymotrypsin-cellu-
lose - Nachweis von Komplexen zwischen α_1 -At und Pro-
teasen im Blutserum. Z. klin. Chem. Klin. Biochem. 11,
286-290 (1973)
- Hunter, C.C., Pierce, J.A., La Borde, J.B.: α_1 -Antitrypsin-Deficiency
J. Amer. med. Ass. 205, 23 (1968)
- Hyslop, N.E., Langley, C.E., Talamo, R.C.: A study of α_1 -at-deficiency
Danish Med. Bul. 16, 283 (1969)
- Jacobsson, A.: Studies on the trypsin and plasmin inh. in human
blood serum. Scand. J. clin. Lab. Invest. 7, Suppl. 14,
83-86 (1953)
- Janoff, A.: Mediators of tissue damage in leucocyte lysosomes.
X. Further Studies on human granulocyte elastase.
Lab. Invest. 22, 228 (1970)
- Küppers, F., Briscoe, W.A., Bearn, A.G.: Hereditary deficiency of
 α_1 -antitrypsin. Science 146, 1678-1679 (1964)
- Küppers, F., Bearn, A.G.: Inherited variations of human α_1 -at.
Science 154, 407-408 (1966)
- Küppers, F., Bearn, A.G.: A possible experimental approach to
the association of hereditary α_1 -at deficiency and
pulmonary emphysema. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 121,
1207-1209 (1966)
- Küppers, F.: Immunologic assay of α_1 -at in deficient subjects and
their families. Humangenetik 5, 54-58 (1967)
- Küppers, F.: Genetically determined differences in the response
of α_1 -at levels in human serum to typhoid vaccine.
Humangenetik 6, 207-213 (1968 b)
- Küppers, F.: Identification of heterozygous state for the α_1 -at
deficiency in Man. Biochem. Gen. 3, 283-288 (1969)

- Küppers, F., Fallat, R. J.: Alpha₁-at-deficiency: A defect in protein synthesis. Clin. chem. Acta 24, 401-403 (1969)
- Küppers, F., Larson, R. K.: Obstruktive lungdisease and α_1 -at-deficiency gene heterozygosity. Science 165, 899-901 (1969)
- Küppers, F.: Alpha₁-At: Physiology, Genetics and Pathology. Humangenetik 11, 177-189 (1971)
- Landsteiner, K.: Zur Kenntnis der antifermentativ., lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. Z. bl. Bakt. 1. Abt. Orig. 27, 357-362 (1900)
- Laurell, C. B., Eriksson, S.: The electrophoretic pattern of serum- α_1 -at deficiency. Scand. J. clin. Lab. invest. 15, 132-140 (1963)
- Laurell, C. B.: Antigen-Antibody crossed electrophoresis. J. Biochem. 10, 358 (1965)
- Laurell, C. B.: Electrophoretic microheterogeneity of serum α_1 -at. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 17, 1-4 (1965 a)
- Laurell, C. B., Kullander, S., Thorell, H.: Effect of administration of a combined estrogen-progesterin contraceptive on the level of indiv. plasma prot. Scand. J. clin. 21, 537-543 (1968)
- Liebermann, J.: Heterozygous and homozygous α_1 -at deficiency in patients with pulmonary emphysema. New. Engl. J. Med. 281, (1969)
- Liebermann, J., Mittmann, C., Schneider, A. S.: Screening for homozygous and heterozygous α_1 -at deficiency. J. Amer. med. Ass. 210, 2055-2060 (1969)
- Liebermann, J., Mittmann, C.: Identification and characteristics of the common α_1 -at Phenotypes. Chest. Vol. 62, 557-564 (1972)
- Lindvall, S., Magnusson, O., Orth, A.: On the inhibition of a fibrinolytic enzyme from Aspergillus oryzae by serum. Acta chem. scand. 23, 2165-2174 (1969)
- Mancini, G., Vaerman, J.-P., Carbonara, A. O., Heremans, J. F.: A single radial diffusion method for the immunological quantification of proteins. Proc. XI. Coll. Protides biol. Fluids, 370-373, Bruges 1963
- Ohlsson, K.: Scand. J. clin. Lab. Invest. 28, 219-224 (1971)
- Opie, E. L., Barker, B. J.: Leucoprotease and antileucoprotease of mammals and of birds. J. exp. Med. 9, 207-221 (1907)
- Ozawa, K., Laskowski, M. Jr.: The reactive site of trypsin inhibitors. J. biol. Chem. 241, 3955-3961 (1966)
- Pierce, J., Eisen, A., Dhingra, H. K.: Pathogenesis of emphysema in α_1 -at deficiency. Clin. Res. 17, 477 (1969)
- Pugliese, C.: Bulletino Scienze med. (1897)
- Rimon, A., Samash, Y., Shapiro, B.: The plasmin inhibitor of human plasma. J. biol. chem. 241, 5102-5107 (1966)
- Samah, Y., Rimon, A.: The plasmin inhibitors of human plasma. III. Purification and partial characterization. J. biol. chem. 234, 1124-1128 (1959)

- Schönenberger, M.: Streulichtmessungen an Plasmaproteinen. Z. Naturforsch. 10 b, 474-478 (1955)
- Sharp, H., Freier, E.: Familial cirrhosis in Mittmann, C., Liebermann, J., editors: Symposium on proteolysis and pulmonary emphysema New York 1971
- Schultze, H. E., Heide, K., Haupt, H.: α_1 -At aus Humanserum. Klin. Wschr. 40, 427-429 (1962)
- Schultze, H. E.: Proc. 9th Congr. Europ. Soc. Haemat. Lisbon 1963
- Schultze, H. E., Heremans, J. E.: Molecular biology of human serum proteins. 354, Elsevier 1966
- Schwarz, O.: Wien. klin. Wschr. 22, 1151 (1909)
- Talamo, R. C., Austen, K. F., Allen, J. D.: Familial emphysema and α_1 -at deficiency. Aspen Emphysema Conference 10, 491-495 (1967)
- Talamo, R. C., Allen, J. D., Kahan, M. G., Austen, K. F.: Hereditary α_1 -at deficiency. New Engl. J. Med. 278, 345 (1968)
- Talamo, R. C.: The α_1 -at in man. J. of Allergie and clinical Immunology. Vol. 48, 240-250 (1971)
- Tarkoff, M., Küppers, F., Miller, W. F.: Pulmonary emphysema and α_1 -at deficiency. Amer. J. Med. 45, 220-238 (1968)
- Turino, G. M., Sen, G., Garg, R. M., Keller, S.: Serumelastase inhibitor deficiency and α_1 -at deficiency in patients with obstr. emphysema. Science 165, 709 (1969)
- Welch, M. H., Reinecke, M. E., Hammerstein, J. F., Guenter, C. A.: α_1 -at deficiency in pulmonary disease: the significance of intermediate levels. Ann. intern. Med. 71, 533-542 (1969)
- Wiens, T.: Münchn. Med. Wschr. 23, 637 (1907)

Danksagung

Dank sagen möchte ich Herrn Prof. Dr. H. H. Naumann für die großzügige Bereitstellung des Arbeitsplatzes; Herrn Dr. K. Hochgesand für die Beschaffung verschiedener Patientenseren, Frau Heindl und Frl. Lempart für die labor-technische Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. K. Hochstrasser für die Überlassung des Themas sowie für seine stets freundliche Art, in der er mir bei auftretenden Schwierigkeiten mit Rat und Tat zur Seite stand.

Lebenslauf

Als Sohn des Ehepaares Walter und Gertrud Pecher geb. Siegl, wurde ich am 9. Oktober 1947 in Stettenhofen bei Augsburg geboren. Nach fünf Jahren Volksschule trat ich mit dem Schuljahr 1959/60 in das Holbein-Gymnasium Augsburg ein, welches ich im Sommer 1968 mit Bestehen des Abiturs verließ. Im Sommersemester 69 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Studium der Zahnmedizin. Nach Bestehen von Vorphysikum und Physikum beendete ich mein Studium im Januar 1975 mit dem Abschluß des Staatsexamens. Noch während der klinischen Semester, im Sommer 1973, begann ich mit dem experimentellen Teil der Dissertationsarbeit im Biochemischen Laboratorium der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik der Universität München.



